

平成27年度 ほくぎん若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名	助成金額
高崎 一郎	大学院・理工学研究部(工学)	700,000 円
研究課題名	IT創薬を活用した新規PAC1受容体アンタゴニストの創製 ～片頭痛を含む慢性疼痛治療薬の開発を目指して～	
研究の概要	<p>[研究開始当初の背景, 研究の目的, 研究の方法等について記入]</p> <p>【研究の背景と目的】</p> <p>厚生労働省の国民生活基礎調査によると, 多くの国民が坐骨神経痛や片頭痛などの慢性の痛みを抱えており, それが生活の質の低下を来す一因となっているが, 現在のところ有効な鎮痛薬は少ない。申請者らは最近, 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の受容体である PAC1 受容体が, 疼痛の慢性化に強く関与することを明らかにした。したがって, PAC1 受容体は新薬開発のターゲットとなることが考えられるが, 現在のところ PAC1 受容体に対する非ペプチド性のアンタゴニストは報告されていない。そこで本研究では, スーパーコンピューターを活用した IT 創薬により, PAC1 受容体の 3次元立体構造から医薬品として優れていると考えられる有機小分子の新たな PAC1 受容体アンタゴニストをデザイン・創製し, 細胞および動物における薬理的評価を行い, これまでにない新しいタイプの慢性疼痛治療薬の開発を目指す。</p> <p>【研究方法】</p> <p>終了済みの研究:イン・シリコ・スクリーニングによる候補化合物の同定</p> <p>すでに三次元構造が明らかとなっている PAC1 受容体(PACAP - PAC1 受容体複合体, PDB ID:2JOD)の構造をもとに, スーパーコンピューターを用いたドッキングベースのイン・シリコ・スクリーニングを行った。我々は, PACAP の Y22, V26, および R30 が PAC1 受容体と密接に相互作用しており, これらのアミノ酸の変異体はいずれも活性が著しく低下するという報告に注目した。そこで PACAP-PAC1 受容体複合体の構造から, PACAP の Y22, V26, および R30 の側鎖上にファーマコホアを定義し, 約 400 万化合物のデータベースから, 候補となる化合物群を約 35,000 個同定した。さらなるドッキングシミュレーションによる絞り込み, 化学特性に基づいた分子類似性解析を行い, その結果, 11 化合物を候補化合物として同定した。</p> <p>研究(1) PAC1 発現細胞を用いた第一次スクリーニング</p> <p>11 種類の候補化合物(上記)を購入あるいは新規に合成し, <i>in vitro</i> 薬理的評価を行う。すなわち, PAC1 受容体発現細胞(CHO 細胞)を用い, PAC1 受容体アゴニストである PACAP あるいは Maxadilan で当該細胞を刺激した際に起こる応答(細胞内 cAMP 濃度の上昇, CREB リン酸化など)を指標に, 候補化合物がアンタゴニストとしての特性を有するかどうかを検討する。なお現段階において, 本研究計画は進行中である。</p> <p>アンタゴニストとしての特性が確認できた候補化合物については, これをヒット化合物</p>	

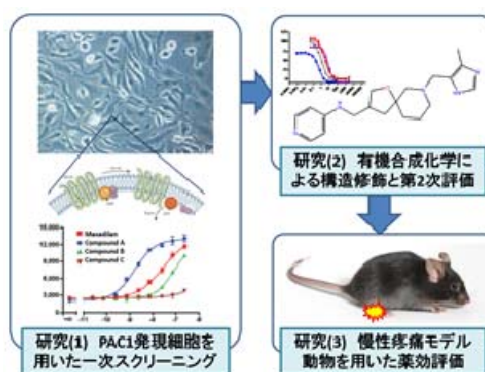
とし、研究(2)へと進む。

研究(2) ヒット化合物に対する構造修飾と PAC1 発現細胞を用いた第 2 次スクリーニング

研究(1)において得られたヒット化合物に対して、有機合成化学による構造修飾(側鎖の導入など)を行い、より効果的な誘導体の創製に取り組む(下図参照)。また、このようにして合成した多様な誘導体の構造-活性相関 (SAR) の検討を踏まえ、再度 IT を活用したドッキングモデルを作成し、よりよい誘導体のデザインとさらなる合成を展開する。このようなプロセスを経て得られた誘導体化合物について、PAC1 受容体発現細胞を用いた *in vitro* 薬理試験を行い、リード化合物の最適化を行う。

研究(3) 慢性疼痛モデル動物を用いた PAC1 受容体アンタゴニスト候補化合物の評価

研究(2)において得られた新規 PAC1 受容体アンタゴニスト候補化合物の *in vivo* における活性を、最終的に慢性疼痛モデル動物を用いて評価する(下図参照)。すなわち、申請者が最近見出した PACAP あるいは Maxadilan の髄腔内注射により作製される慢性疼痛モデルマウスや、坐骨神経を損傷による神経障害性疼痛モデルマウス、種々の偏頭痛モデルマウスを用いて行動薬理的に評価する。新規候補化合物を全身(経口、腹腔内)あるいは局所(髄腔内)に投与し、疼痛モデルマウスで見られる疼痛様行動に対して、化合物の効果を総合的(用量依存性、作用時間、副作用の有無など)に評価する。



上のような研究計画のもと、化合物の最適化・動物モデルを用いた行動薬理的評価を行うことで、オリジナリティーの高い富山発の新規慢性疼痛治療薬の創製を目指す。

[研究成果について具体的に記入]

研究成果(1) PAC1 発現細胞を用いた第一次スクリーニング

すでに三次元構造が明らかとなっている PAC1 受容体の構造をもとに、スーパーコンピュータを利用したイン・シリコ スクリーニングを行い、その結果、11 種類の化合物を PAC1 受容体アンタゴニストの候補化合物として同定することができた。11 種類化合物のうち 10 種類の化合物をナミキ商事より購入(1 化合物は製造中止のため未購入)し、PAC1 受容体発現細胞(CHO 細胞および PC12 細胞)を用いたアッセイを行った。なお、10 種類の化合物は PA-1~PA-10 と命名し、以下の実験に使用した。

PAC1 受容体発現細胞を PACAP で刺激すると、Gs タンパクを共役した PAC1 受容体からの細胞内情報伝達により、AC 活性化→cAMP 産生→PKA 活性化→CREB リン酸化の経路を活性化させる。PC12 および PAC1/CHO 細胞を PACAP(1 nM)で刺激すると、CREB のリン酸化(ウェスタンブロット法)を誘導することができる(図 1)。そこでまず、PACAP による CREB のリン酸化を指標に、候補化合物の前処理の効果を検討した。

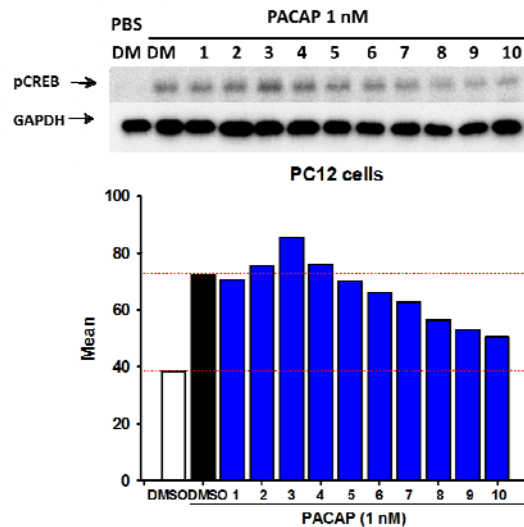


図 1 PC12 細胞を用いた候補化合物の評価

Name	PC12	PAC1/CHO
PA-1	-	-
PA-2	-	++
PA-3	-*	+
PA-4	-	-*
PA-5	-	+
PA-6	+	++
PA-7	+	++
PA-8	++	++
PA-9	++	+
PA-10	++	+

表 1 PC12 および PAC1/CHO 細胞を用いた検討(まとめ)

-:効果なし, +:抑制, ++:強い抑制, *:増強

研究の成果

ウェスタンブロットの結果から、PA-6 から PA-10 までの 5 化合物がヒットした(図 1, 表 1)。更なる絞込みを行うため、cAMP の産生を cAMP Glo kit(Promega 社)を用いて検討したところ、PA-8 と PA-9 が強く cAMP の産生を抑制することを明らかにした。以上の成果から PA-8 と PA-9 が PAC1 受容体アンタゴニストとしての特性を有している可能性が示唆された(表 1)。そこで、PA-8 と PA-9 を第 1 次ヒット化合物として、以降の研究を展開した。

研究成果(2) ヒット化合物に対する構造修飾と PAC1 発現細胞を用いた第 2 次スクリーニング

研究成果(1)において、PA-8 および PA-9 が新規の PAC1 受容体アンタゴニスト候補化合物となる可能性が示唆された。そこで、さらに強力かつ選択的な PAC1 受容体アンタゴニストの創製を目指し、PA-8 および PA-9 の構造をもとに、側鎖の置換・除去等を行い誘導体化合物の合成を行った。現在までに PA-8 をリード化合物として 11 化合物(PA-801~PA811)、PA-9 をリード化合物として 13 化合物(PA-901~PA913)の合成に成功した。現在、PAC1 受容体発現細胞(CHO 細胞および PC12 細胞)を用いたアッセイを進め、現在までに作製した化合物のうち、3 化合物が抑制効果を示した。なお、当該化合物については新規化合物であり、物質特許の申請を今後行う予定である。

研究(3) 慢性疼痛モデル動物を用いた PAC1 受容体アンタゴニスト候補化合物の評価

研究成果(1)において PA-8 および PA-9 が新規の PAC1 受容体アンタゴニスト候補化合物となる可能性が示唆された。そこで、疼痛モデル動物を用いた PA-8 および PA-9 の鎮痛効果を検討した。用いた疼痛モデルは、①脊髄神経結紮による神経障害性疼痛モデルマウス、②PACAP および Maxadilan の脊髄くも膜下腔内投与によって誘発される急性疼痛(後肢の舐め行動、足振り行動など)モデルマウスである。

マウスの脊髄神経(L5)をシルク糸できつく結紮すると、結紮 1 日後から少なくとも 4 週間持続する機械的アロディニア(触刺激に対する過敏応答)が観察された。神経結紮 2 週間後に PA-8(10, 30 および 100 mg/kg)を腹腔内投与し、アロディニア反応に対する効果を検討したところ、抑制効果は確認できなかった(data not shown)。そこで、神経結紮の直前に PA-8(10, 30 および 100 mg/kg)を腹腔内投与し、アロディニアの発症に及ぼす効果を検討した。PA-8 の単回投与はアロディニアの発症を抑えることはできなかったが、神経結紮直前に投与を含め、結紮 1 日後から 1 日 1 回投与を繰り返したところ、用量依存的にアロディニアの発症を抑制することができた(図 2)。また 7 日間の投与後、休薬を行ったが、その後も持続してアロディニアの抑制効果が観察された(図 3)。以上の結果は、神経障害性疼痛の治療効果については今回の結果からは得られなかったが、PA-8 は予防効果とその後のアロディニアの持続を抑制する効果を有することが示唆された。PA-8 が選択的 PAC1 受容体アンタゴニストであるならば、PAC1 受容体は、神経障害性疼痛の発症段階とその後の慢性化に重要な役割を果たしている可能性があり、今後の詳細な検討が必要である。なお、PA-9 については現在検討中である。

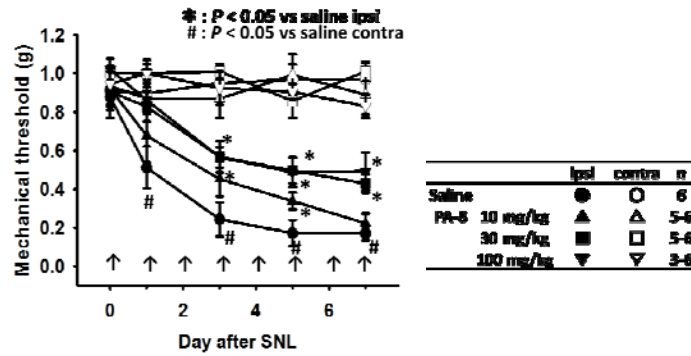


図2 脊髄神経結紮モデルマウスのアロディニア反応に対するPA-8 前処置および繰り返し投与の効果

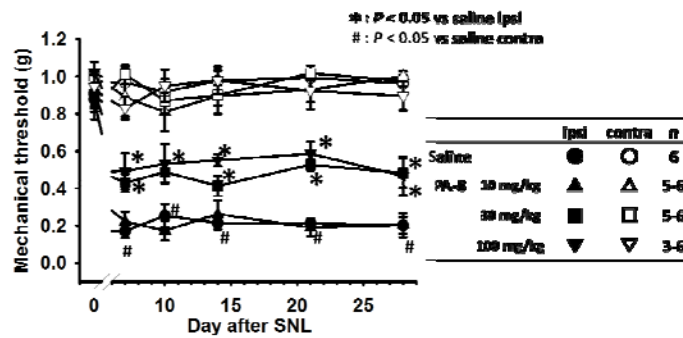


図3 PA-8 繰り返し投与後のアロディニア反応

次に PACAP および Maxadilan 髄腔内投与による急性疼痛に対する PA-8 および PA-9 の効果を検討した。PACAP (100 pmol) あるいは Maxadilan (100 pmol) を脊髄くも膜下腔内に投与すると、投与直後から後肢の足振り反応や足舐め行動といった疼痛用行動が出現し、これらは投与後 1 時間にわたって観察された(図 4)。PA-8 を単独で脊髄くも膜下腔内に投与したところ、PA-8 の投与では疼痛用行動はまったく観察されなかった(図 4)。一方で、PA-9 の髄腔内投与では弱い疼痛用行動が惹起された(図 4)。以上の結果は、PACAP および Maxadilan は PAC1 受容体を刺激することで、疼痛用行動を誘発するのに対し、PA-8 は疼痛用行動を惹起せず、PAC1 アゴニストとしての特性は有さないことが示唆された。PA-9 による疼痛用行動の惹起メカニズムについては現在検討中である。

PACAP (100 pmol) 誘導性の急性疼痛用行動に対し、PA-8 (100 pmol) と PA-9 (100 pmol) の PACAP との同時投与の効果を検討したところ、PA-8 は PACAP 誘導性の急性疼痛をほぼ完全にブロックした(図 5)。一方、PA-9 の効果は部分的であったが、PACAP による疼痛行動を抑制した(図 5)。

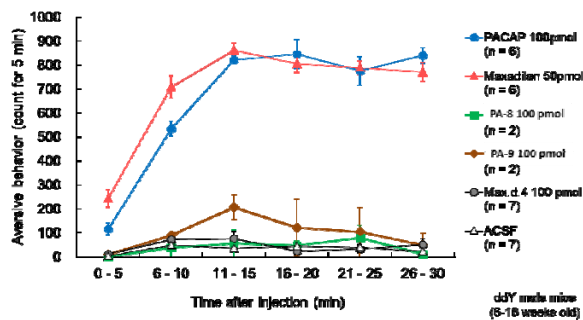


図4 PACAP, Maxadilan, PA-8,およびPA-9の脊髄くも膜下腔内の効果

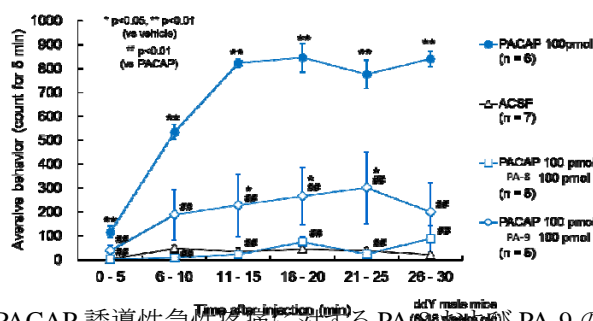


図5 PACAP 誘導性急性疼痛に対するPA-8,およびPA-9の効果

以上の結果から、極めて低濃度のPA-8がPACAP誘導性の疼痛用行動をほぼ完全に抑制したことから、PA-8はPACAPが媒介する疼痛に対する有効な鎮痛薬となる可能性がある。上述したように、PA-8をリード化合物とした誘導体化合物を現在作製中であり、in vitroの結果が出次第、疼痛モデルマウスを用いた検討を行い、PA-8との比較、副作用等の総合的評価を行い、よりよい鎮痛薬の開発に向けての研究を進めたい考えである。一方、PA-9はPACAP誘導性の疼痛反応を抑制したものの、PA-9単独の投与で疼痛用行動が出現した。PA-9も同様に誘導体化合物の合成を進めており、これら化合物が疼痛を惹起せず、PACAPによる疼痛反応を抑えるかどうか今後検討していく予定である。

今回の実験では、神経障害性疼痛モデルおよびPACAP誘導性急性疼痛モデルマウスを用いて化合物の評価を行ったが、今後は臨床で問題となっている、片頭痛、糖尿病性神経障害や抗がん剤(オキサリプラチンやパクリタキセル)による疼痛に対し、PA-8およびPA-9あるいはこれらの誘導体化合物が鎮痛効果を有するか否か研究を発展していきたいと考えている。特に近年、片頭痛とPACAP-PAC1受容体との関連性を示唆する報告が相次ぎ、PAC1受容体アンタゴニストは新規片頭痛治療薬となる可能性を秘めている。現在、適切な片頭痛モデル動物の開発と薬効評価に関する研究にも取り組んでいるところである。

なお、本研究を実行するにあたり、研究費を助成賜りました北陸銀行様にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

<p>研究成果発表状況</p>	<p>[雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成したWebページ, 産業財産権(特許権等)の出願・取得状況について記入]</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. 渡辺藍, 岡田卓哉, 福地守, 合田浩明, 栗原崇, 宮田 篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一郎, In silico and pharmacological screening identify novel PAC1 receptor antagonists. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日, 横浜(パンフィコ横浜)</p> <p>2. 渡辺藍, 岡田卓哉, 福地守, 合田浩明, 栗原崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一郎. 新規鎮痛薬の開発を目指した PAC1 受容体アンタゴニストの創出と薬理的評価 日本薬学会北陸支部第 127 回例会, 2015 年 11 月 15 日, 富山(富山大学杉谷キャンパス)</p> <p>3. 渡辺藍, 栗原崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一郎. PAC1 受容体アンタゴニストの創出と薬理的評価. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会, 2015 年 5 月 28 日, 富山(オークスカナルパークホテル富山)</p>																							
<p>経費の執行状況</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>区分</th> <th>執行額(円)</th> <th>備考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>化合物</td> <td>183,394 円</td> <td></td> </tr> <tr> <td>遺伝子解析関連</td> <td>253,545 円</td> <td></td> </tr> <tr> <td>細胞培養関連</td> <td>128,919 円</td> <td></td> </tr> <tr> <td>アッセイ関連</td> <td>131,544 円</td> <td></td> </tr> <tr> <td>その他消耗品</td> <td>2,598 円</td> <td></td> </tr> <tr> <td>合計</td> <td>700,000 円</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	区分	執行額(円)	備考	化合物	183,394 円		遺伝子解析関連	253,545 円		細胞培養関連	128,919 円		アッセイ関連	131,544 円		その他消耗品	2,598 円		合計	700,000 円			
区分	執行額(円)	備考																						
化合物	183,394 円																							
遺伝子解析関連	253,545 円																							
細胞培養関連	128,919 円																							
アッセイ関連	131,544 円																							
その他消耗品	2,598 円																							
合計	700,000 円																							